

[文章编号] 1000 - 4718(2006)09 - 1784 - 04

小鼠脑中 Zn 元素和 ZnT3 mRNA 表达的研究*

张元勋¹, 龙建纲², 王荫淞¹, 李德禄¹, 王福佛²,
沈慧², 李爱国¹, 张桂林¹, 黄宇营³, 何玮³

(¹中科院上海应用物理研究所, 上海 201800; ²第二军医大学军队卫生教研室, 上海 200433;

³中科院北京高能物理研究所, 北京 100039)

[摘要] 目的: 研究 ZnT3 mRNA 的表达与 Zn 等金属元素在脑中精细分布的相互作用和功能。方法: 使用同步辐射 X 射线荧光法(SRXRF)测定小鼠全脑和脑切片中 Zn 等金属元素分布,同时使用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA 的表达量。结果: 脑中 Zn 元素不是均匀分布的, 主要分布在皮层、海马和齿状回部位。大脑皮层、海马和睾丸中的 ZnT3 mRNA 有较高丰度, 而其它组织中未检出 ZnT3 mRNA。结论: ZnT3 能促进胞浆内 Zn 富集于囊泡中, 通过介导胞浆锌的跨膜转运过程, 构造囊泡“锌池”。

[关键词] 脑; 锌; 锌转运体; 基因表达

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study of zinc element and ZnT3 mRNA expression in mouse brain

ZHANG Yuan - xun¹, LONG Jian - gang², WANG Yin - song¹, LI De - lu¹, WANG Fu - di², SHEN Hui², LI Ai - guo¹, ZHANG Gui - lin¹, HUANG Yu - ying³, HE Wei³

(¹Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; ²Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

[ABSTRACT] AIM: To explore the interaction and function between ZnT3 mRNA expression and zinc elemental distribution in brain slice of mouse. METHODS: Zinc distribution was determined by SRXRF and ZnT3 mRNA expression in tissue was examined by RT-PCR method. RESULTS: Zinc content in cerebral cortex and hippocampus was significantly higher than that in other positions. The highest expression of ZnT3 mRNA was observed in cerebrum, hippocampus and testis. However, the ZnT3 mRNA was not detected in heart, liver, lung, spleen, kidney, intestine, olfactory bulb and cerebellum. CONCLUSION: ZnT3 facilitates the accumulation of zinc in synaptic vesicles and may play important roles in structuring of vesicular zinc pool.

[KEY WORDS] Brain; Zinc; Zinc transporter; Gene expression

锌是人体必需微量元素, 几乎参与机体内所有的生理代谢过程, 尤其与脑发育及功能有密切联系^[1]。锌在脑组织中的转运过程是锌营养的重要研究内容, 研究锌在脑组织中的转运过程对深入理解锌影响脑发育及功能机制具有重要意义。

在 1995 年以前, 国际上许多学者对锌转运过程进行了大量研究, 但是进展缓慢, 没有发现任何一个直接参与锌转运的蛋白质。直到 1995 年至 1997 年, Palmiter 等^[2]及 Huang 等^[3]连续克隆到 4 种直接参与锌转运的基因, 被称为锌转运体(zinc transporter,

ZnT)。目前的一些研究结果表明, 这些 ZnT 蛋白都具有多个跨膜域, 富含组氨酸、脑内环等结构特征。推断 ZnT 在机体中具有一定的生理功能, 参与锌通过细胞膜的流出和流进过程, 可能是介导锌离子进出细胞的“膜受体”, 并可能在脑中发挥重要的生理功能^[4], 例如 ZnT3 可能参与锌摄入神经元囊泡及睾丸中的过程^[5]。

ZnT 的发现使锌研究有了突破性进展, 为锌在细胞和分子水平的更深刻认识奠定了重要基础。随着研究的深入, 对于锌元素与锌转运体之间的调节机

[收稿日期] 2004 - 12 - 10 [修回日期] 2005 - 04 - 06

* [基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 10175085); 北京正负电子对撞机国家实验室项目(No. 03025)资助

Tel: 021 - 59554767; E - mail: yxzhang@sinap.ac.cn

制, 锌转运体在锌内稳态中的功能作用以及锌转运体和锌的特异分布与相应细胞间相互作用的认识还有待深化。本项研究使用同步辐射 X 荧光微探针 (SRXRF) 微区扫描分析技术, 结合使用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 等分子生物学新技术, 研究锌等元素在脑切片中的分布与锌转运体表达模式之间的相互关系, 为阐明锌转运体及锌等元素在脑功能中作用机理提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 动物模型 选用成年雄性 ICR 小鼠 18 只, 体重 17-20g, 由上海西普尔-必凯公司提供。随机分成 3 组: 缺锌组、对照组和高锌组, 每组 6 只, 分笼饲养。含锌饲料购自美国 Dyets 公司, 参照美国营养协会报告的 AIN-93G 配方配制纯化饲料^[6], 饲料含锌量分别为 <1、30 和 180 mg/kg。动物饲养在塑料笼具内, 自由饮用蒸馏水, 照明周期为 12 h/d, 室温控制在 21-25 °C, 动物饲养实验室符合国标清洁级。

1.2 脑切片 将分组饲养 4 周后的小鼠断头处死, 全脑、心、肝、肺、肾、小肠、睾丸等组织器官快速分离后置于液氮内保存。使用冰冻切片机制备脑组织切片, 将全脑组织置于切片机架, 快速冷冻固定后, 作冠状连续冷冻切片, 切片厚度 10-20 μm, 切片随即平铺在 6 μm 厚度的聚乙烯薄膜上, 并用尼龙框架固定后置于干燥器内自然干燥, 以备扫描分析时使用。

2 方法

2.1 使用 SRXRF 宽束技术测定微量元素含量 在北京正负电子对撞机的 4W1B 同步辐射 X 射线荧光分析站上对鼠脑中微量元素的测定。实验时将同步辐射产生的直径为 6 mm 的宽束白光直接照射样品, 在束流的引出端放置合适的铅吸收片, 目的是降低来自高原子序数元素的 LX 射线和较低原子序数元素的 KX 射线, 使感兴趣元素的特征 X 射线以适当的强度进入探测器, 防止脉冲堆积、死时间过大和出现相加峰。束流轰击样品时产生的元素特征 X 射线由 Si(Li) 半导体探测器接受, 信号经过前置放

大器、主放大器 and 堆积排除器后进入多道能谱仪, 最后由计算机系统对能谱解析和数据处理^[7]。

2.2 使用 SRXRF 微探针扫描锌元素的精细分布 小鼠脑切片微区元素扫描测定需要对上述的同步辐射 X 射线荧光分析实验装置进行变动升级。首先是在 X 射线束流引出端安装从日本引进的电子 4 刀狭缝仪, 调整狭缝宽度, 使入射光束成为 0.2 mm × 0.2 mm 微束。然后安装由微机程控的三维移动样品平台, 并在微机上设置全自动扫描能谱获取系统, 详细实验装置可参阅文献^[8]。实验测定时将脑切片样品置于三维移动平台上, 使入射的 X 射线微束沿着设定的范围逐点 (point by point) 进行扫描分析测定。

2.3 RT-PCR 方法检测小鼠各组织中 ZnT3 mRNA 的表达 首先取小鼠脑、心、肝、肺、肾、小肠、睾丸等组织适量, 一步法抽取组织总 RNA, 然后设计 ZnT3 引物, 以 100 ng 小鼠海马总 RNA 为模板, RT-PCR 克隆 ZnT3 片段。RT-PCR 扩增反应体积为 20 μL, 通过模板量、退火温度和循环数的调整用于确定各组织 RNA 的反应参数, 实验时以小鼠 β-肌动蛋白 (β-actin) 作内对照。RT-PCR 反应产物作琼脂糖凝胶电泳分析, 使用 SX-IMAGE 凝胶成像系统, 对电泳图作灰度扫描, 将获取的 ZnT3/β-actin 灰度扫描比值进行方差分析和不同组织间的相互比较。

结 果

1 小鼠脑组织中的微量元素含量

在实验动物喂养过程中, 对于缺锌组小鼠在使用缺锌饲料喂养 10 d 后, 小鼠开始出现皮毛失去光泽并逐渐开始变黄脱落, 足爪脱屑, 嘴角毛发脱落并有局部出血等缺锌症状表现。使用常规同步辐射 X 荧光法, 对实验培育的缺锌组、正常组和高锌组小鼠的全脑组织进行了多元素测定, 图 1 是一个典型的同步辐射 X 射线微束激发脑样品的能谱图, 使用 AXIL 解谱软件^[9], 可定量得到 Zn、Cu、Fe、Ca、K 等微量元素浓度结果。由表 1 可见, 高锌组和对照组的脑锌含量显著高于缺锌组 ($P < 0.05$)。对于铜、铁、钾和钙等元素含量, 高锌组虽有增加, 但 3 组间无显著差异。

表 1 小鼠脑组织中元素的干重含量

Tab 1 Results of elemental contents in mouse brain ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of dry matter. $\bar{x} \pm s$. $n=6$)

Group	Zn	Cu	Fe	K	Ca
Zinc deficiency	24.1 ± 3.2	9.6 ± 1.3	198 ± 24	8 814 ± 930	286 ± 30
Control	37.6 ± 6.7	10.8 ± 3.0	240 ± 35	9 423 ± 847	302 ± 41
High zinc	42.0 ± 5.0*	13.2 ± 2.7	256 ± 28	9 632 ± 879	302 ± 29

* $P < 0.05$ vs zinc deficiency group.

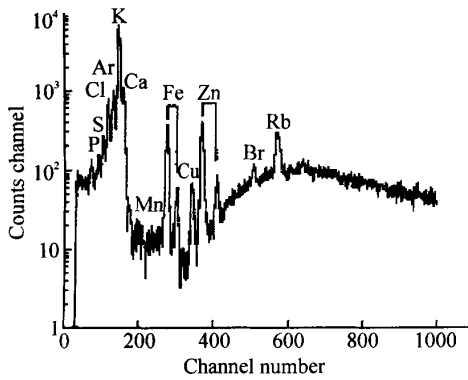


Fig 1 A typical SRXRF spectrum of mouse brain.

图1 鼠脑样品的同步辐射 X 荧光能谱图

2 脑切片中锌元素的分布

使用 SRXRF 微探针针对脑切片进行扫描分析, 可得到锌等微量元素在脑微区组织中的精细分布。图 2 是脑切片示意图, 图 3 是对应于切片组织的 Zn 元素分布。使用美国 Micromatter 公司提供的一套薄膜标准样品作为分析系统的微区定量标准, 可得到脑切片中 Zn 元素的浓度分布。由图可见, 锌元素在脑中不是均匀分布的, 以皮质和海马等组织中含量较多, 尤其是喂养高锌饲料的小鼠海马和皮质的锌浓度明显高于对照组和低锌组, 而其它脑区未见显著性变化。

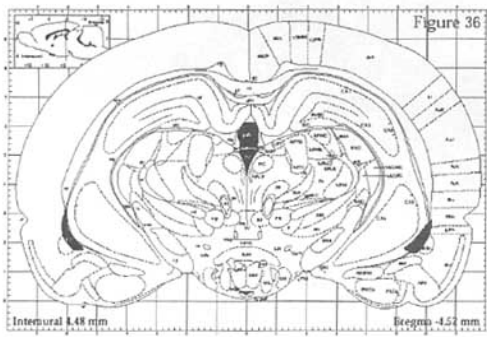


Fig 2 A slice diagram of mouse brain.

图2 小鼠脑切片示意图

3 小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA 的表达量

使用 RT-PCR 方法, 以 β -actin 作内对照, 对小鼠各组织总 RNA 中所含的 ZnT3 mRNA 进行检测。结果表明, 在睾丸和脑组织中的 ZnT3 mRNA 有较高丰度, 而在心、肝、脾、肺、肾、小肠等组织中未检出 ZnT3 mRNA 的表达。为了进一步详细了解脑的各部分组织中 ZnT3 mRNA 的表达情况, 又将小鼠嗅球、大脑皮层、小脑皮层、海马等各部分组织检测 ZnT3 mRNA, 从图 4 的检测结果可发现大脑皮层、海

马中 ZnT3 mRNA 易于检出, 而小脑和嗅球中未检出 ZnT3 mRNA。统计表明, 海马和睾丸之间的 ZnT3 mRNA 表达没有显著差异, 而它们两者与大脑皮层相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

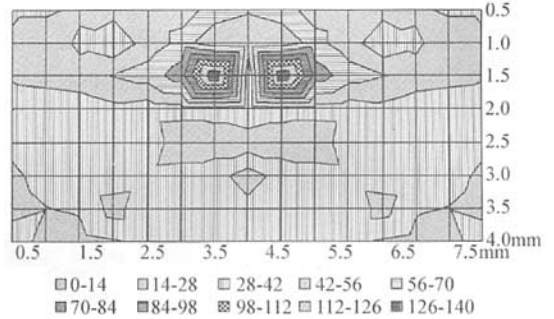


Fig 3 Zinc concentration distribution in brain slice of mouse ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

图3 锌元素在小鼠脑切片中的含量分布

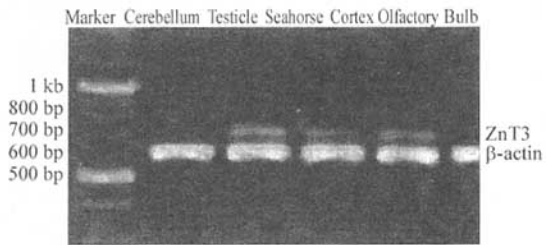


Fig 4 ZnT3 mRNA expressions in mouse tissues by RT-PCR.

图4 RT-PCR 法检测小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA

讨 论

脑是生物体结构复杂, 功能高超的器官, 锌离子是脑内含量最丰富的元素之一, 在脑发育和功能中发挥重要作用。脑内锌和其它必需微量元素如铜、铁、镁、钙等存在着相互影响彼此协调的关系, 其中之一含量反常必然会影响到其它元素的浓度, 从而导致相应的功能异常。脑内锌有其严格的调控方式^[5], 锌在蛋白质中与巯基结合比较稳定, 很难从蛋白质中置换出来。锌离子在神经元突触囊泡中富集, 锌转运体包括 ZnT1、ZnT2 和 ZnT3 的跨膜转运有利于 Zn 在囊泡中的聚集。Zn 通过调节神经递质的释放, 通过电压门控和配体门控通道影响神经兴奋性, 提示 Zn 是神经系统的内源性神经兴奋性调节物。

由图 3 可见, 海马中的锌含量可高达 $100 \mu\text{g}/\text{g}$, 是锌含量低的道束区(胼胝体、半卵圆中心、穹窿脚)部位 5-10 倍。提示海马是中枢神经系统对锌摄入较敏感的区域^[11,12], 营养性缺乏和过量都会导致脑元素的变化, 造成严重的行为及神经学后果。例如缺锌会改变神经结构和突触发生, 影响大脑中锌的

动态平衡,导致记忆损伤和大脑机能障碍等。

锌是1种基本的营养元素,大部分锌在神经元和神经胶质细胞的锌金属蛋白中发挥作用。锌能在这些囊泡中聚集是因为存在着锌特异性泵,即锌转运蛋白 ZnT3,在神经传递突触中作为1种内源性神经调质起作用。SRXRF 扫描微探针获取的脑切片 Zn 元素的精细分布与 RT-PCR 法对大脑皮层和海马结构中 ZnT3 mRNA 表达量有特异性分布的结果相对应,表明大脑皮层和海马结构中 ZnT3 mRNA 分布区域与这两部分组织中的锌分布相一致,既含有转运蛋白 ZnT3,也含有高浓度的锌,说明这两种标志性物质共同存在。初步结果可以推断,大脑皮层和海马中聚集了高浓度锌元素。ZnT3 参与突触囊泡中锌的摄取转运过程,突触囊泡锌水平由其膜上 ZnT3 的表达量决定,其相互依存关系是调节细胞锌稳态的一个基础。ZnT3 对锌具有高度专一性,ZnT3 通过介导胞浆锌的跨囊泡膜转运,构造囊泡“锌池”。与 Palmiter 等^[5]认为脑中存在“锌池”的推断结果一致,这些部位的锌离子高度浓集,表明锌对神经元信号转导发挥调控作用的关键环节是锌离子的跨膜转运过程。ZnT3 伴随某些神经递质(如谷氨酸、GABA 等)的释放,调控神经元的信号转导,进而参与脑功能的调节。

[参 考 文 献]

- [1] Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain[J]. *Brain Res Rev*, 2000, 34(3): 137-148.
- [2] Palmiter RD, Cole TB, Findley SD. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration[J]. *EMBO J*, 1996, 15(5): 1784-1791.
- [3] Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(2): 292-297.
- [4] McMahon RT, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4841-4846.
- [5] Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14934-14939.
- [6] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *J Nutr*, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [7] Wu YR, Cao ZY, Xiao YA, et al. XRF experiments at BSRF[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1995, A359(1,2): 291-294.
- [8] Zhang YX, Cheng F, Li DY, et al. Synchrotron radiation XRF microprobe investigation of elemental distribution in femoral head slice with osteoporosis[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(13): 1138-1141.
- [9] Zhang YX, Li DY, Zhang YP, et al. Study of metallic element distribution in cancellous bone of femoral head both youth and old people by PIXE[J]. *International Journal of PIXE*, 1999, 9(3,4): 291-296.
- [10] Smith QR. Regulation of metal uptake and distribution within brain[J]. *Nutrition and the Brain*, 1990, 8(1): 25-74.
- [11] Itoh T, Saito T. Effect of zinc deficiency on the response of immobilization stress for the adult rat[J]. *Trace Elements Electrolytes*, 2000, 17(2): 76-81.
- [12] Atsushi T, Sachiyo TS. Transient learning impairment of adult rats fed zinc deficient diet[J]. *Brain Res*, 2000, 859(2): 352-357.

小鼠脑中Zn元素和ZnT3 mRNA表达的研究

作者: 张元勋, 龙建纲, 王荫淞, 李德禄, 王福倌, 沈慧, 李爱国, 张桂林, 黄宇营, 何玮, ZHANG Yuan-xun, LONG Jian-gang, WANG Yin-song, LI De-lu, WANG Fu-di, SHEN Hui, LI Ai-guo, ZHANG Gui-lin, HUANG Yu-ying, HE Wei

作者单位: 张元勋,王荫淞,李德禄,李爱国,张桂林,ZHANG Yuan-xun,WANG Yin-song,LI De-lu,LI Ai-guo,ZHANG Gui-lin(中科院上海应用物理研究所,上海,201800), 龙建纲,王福倌,沈慧, LONG Jian-gang,WANG Fu-di,SHEN Hui(第二军医大学军队卫生教研室,上海,200433), 黄宇营,何玮,HUANG Yu-ying,HE Wei(中科院北京高能物理研究所,北京,100039)

刊名: 中国病理生理杂志 **ISTIC|PKU**

英文刊名: CHINESE JOURNAL OF PATHOPHYSIOLOGY

年,卷(期): 2006, 22(9)

引用次数: 1次

参考文献(12条)

1. Takeda A Movement of zinc and its functional significance in the brain 2000(3)
2. Palmiter RD, Cole TB, Findley SD ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating resicular sequestration 1996(5)
3. Huang L, Gitschier J A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse 1997(2)
4. McMahon RT, Cousins RJ Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc 1998(9)
5. Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles 1996(25)
6. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet 1993(11)
7. Wu YR, Cao ZY, Xiao YA XRF experiments at BSRF 1995(1-2)
8. ZHANG Yuanxun, CHENG Feng, LI Deyi, WANG Yinsong, ZHANG Guilin, Xu Hongjie, LIAO Wensheng, Tang Tingting, HUANG Yuying, HE Wei Synchrotron radiation XRF microprobe investigation of elemental distribution in femoral head slice with osteoporosis [期刊论文]-科学通报(英文版) 2001(13)
9. Zhang YX, Li DY, Zhang YP Study of metallic element distribution in cancellous bone of femoral head both youth and old people by PIXE 1999(3-4)
10. Smith QR Regulation of metal uptake and distribution within brain 1990(1)
11. Itoh T, Saito T Effect of zinc deficiency on the response of immobilization stress for the adult rat 2000(2)
12. Atsushi T, Sachiyo TS Transient learning impairment of adult rats fed zinc deficient diet 2000(2)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 张元勋, 王荫淞, 李德禄, 李爱国, 张桂林, 龙建纲, 王福倌, 沈慧, 秦海宏, 黄宇营, 何玮 同步辐射X荧光光谱用于鼠脑锌元素分布的研究 -核技术 2004, 27(9)
为了探索锌等金属元素在脑中的精细分布与ZnT3 mRNA表达之间的相互作用和功能, 本研究使用同步辐射X射线荧光技术(SRXRF)测定小鼠全脑和脑切片中锌等金属元素的分布, 同时使用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测小鼠各组织中的ZnT3 mRNA的表达量. 分析结果表明, 脑中锌元素不是均匀分布的, 主要分布在皮层、海马和齿状回部位, 它们的锌浓度比道束区高出5-10倍. 与此结果相对应的是大脑皮层、海马和睾丸中的ZnT3 mRNA有较高丰度, 而其他组织中未检出ZnT3 mRNA. 进一步的推断提示ZnT3能促进胞浆内的锌富集于神经元囊泡中, 通过介导胞浆锌的跨膜转运过程构造囊泡的“锌池”.
2. 期刊论文 杨丹, 王清华, 孙凤, 王占友, 王玥, 高慧玲, 蔡际群, YANG Dan, WANG Qing-hua, SUN Feng, WANG Zhan-you, WANG Yue, GAO Hui-ling, CAI Ji-qun 自发性癫痫大鼠脑海马两种锌转运体表达的研究 -中华神经医学杂志

目的 探讨反复癫痫发作后的自发性癫痫大鼠(SER)与正常Wistar大鼠海马钙转运体1和3的表达与癫痫的相关性,以及癫痫发作后海马内含锌神经内元锌稳态的改变情况.方法 应用Western blot和RT-PCR方法分析反复癫痫发作后的SER与正常Wistar大鼠海马钙转运体1和3表达情况.结果 SER反复癫痫发作后海马钙转运体1蛋白及mRNA表达均明显高于正常Wistar大鼠,差异有统计学意义(P<0.05);钙转运体3蛋白表达与正常Wistar大鼠相比无明显改变,差异无统计学意义(P>0.05).结论 反复癫痫发作后SER海马可能在神经元尤其突触后神经元内出现锌浓度增高现象,钙转运体1表达上调可通过降低神经元内Zn²⁺水平对抗癫痫发作引起的神经元损伤,从而起到保护神经元的作用.

3. 学位论文 刘新 锌对铝所致未成年大鼠血脑屏障完整性破坏的保护作用 2007

铝的神经毒性作用日益引起人们的重视.已有研究发现,铝最容易引起神经元损伤,影响智力发育,且铝导致的神经系统功能障碍,是一个长期的慢性的病理过程,涉及到脑发育的各个阶段.大量研究表明,许多神经系统疾病,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、透析综合症、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等均与慢性铝蓄积有关.因此,对铝中毒寻找有效的预防与治疗措施具有重大的临床意义.通过对铝中毒患者进行观察发现,脑内有过量的铝蓄积时,会引起血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的结构和功能损伤.同时发现,锌对于此种损伤具有一定的保护作用,但是浓度过高反而会引引起神经细胞的损伤.本研究旨在探讨不同浓度的锌对脑内铝含量的影响,以便寻出最佳给药浓度来保护铝对脑的损伤,从而为预防慢性铝金属中毒和采取适当的治疗措施提供理论依据.方法: 1、分组 健康40日龄SD大鼠300只,按体重随机分到下列各实验组中,分别为:A对照组;B低铝组;C中铝组;D高铝组;E低锌组;F高锌组;G中铝+低锌组;H中铝+高锌组;I高铝+低锌组;J高铝+高锌组.

2、给药 腹腔注射无菌的生理盐水或低、中、高浓度AlCl₃溶液,造成铝中毒;口腔灌胃给予低、高浓度ZnSO₄溶液.每连续处理3天间歇1天,共计8个周期. 3、定期称动物体重增长情况. 4、利用经典Morris水迷宫检测各组动物的学习记忆能力. 5、测定脑组织EB含量来检测各组动物BBB通透性的改变. 6、应用透射电镜观察脑超微结构的变化. 7、免疫组化荧光染色和正置荧光显微镜观察脑组织血管内皮细胞上的细胞骨架蛋白F-actin的表达情况. 8、免疫组化SABC染色法观察紧密连接相关蛋白occludin的分布位置以及表达水平的变化. 9、Western blot法测定紧密连接相关蛋白occludin的含量变化. 10、统计分析用SPSS13.0 (statistical package for the social science, SPSS) 统计分析软件对数据进行处理, P<0.05视为有统计学意义. 结果: 一、各组动物体重增长情况:对照组大鼠体重增长值(115.6±4.8g)与中铝组(82.4±22.2g)、高铝组(55.8±6.80g)相比均具有统计学差异, P<0.05; 中铝组(82.4±22.2g)与中铝+低锌组(108.8±12.4g)、中铝+高锌组(107.0±9.59g)相比均具有显著差异, P<0.01; 高铝组(55.8±6.80g)与高铝+低锌组(93.0±4.47g)、高铝+高锌组(105.0±10.0g)相比均具有显著差异, P<0.01. 二、Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆能力各组之间的大鼠逃避潜伏期和空间定位航行实验结果无统计学差异, P>0.05.

三、BBB通透性的变化:对照组的脑组织EB含量(0.011±0.003 μg/g脑重)与低铝组(0.053±0.007 μg/g脑重)、中铝组(0.085±0.012 μg/g脑重)相比均有显著差异, P<0.01; 中铝组(0.110±0.021 μg/g脑重)与低铝组(0.011±0.003 μg/g脑重)、中铝组(0.085±0.012 μg/g脑重)相比均有显著差异, P<0.01; 中铝组(0.110±0.021 μg/g脑重)与高铝+低锌组(0.061±0.003 μg/g脑重)、高铝+高锌组(0.042±0.006 μg/g脑重)相比均具有显著性差异, P<0.01. 四、透射电镜观察脑超微结构的变化:电镜结果显示,对照组动物BBB紧密连接结构完整,内皮细胞核近圆形,核膜清晰,染色质,线粒体、高尔基体等均具有完整结构;中铝、高铝组大鼠内皮细胞核出现不同程度的变形,线粒体和高尔基体偶有水肿,高铝组伴有异染色质向细胞核的边集,内皮细胞间的紧密连接模糊,电子密度高;中铝+低锌组、中铝+高锌组、高铝+高锌组动物BBB的超微结构保持较完整,功能较正常,但也偶有内皮细胞核的轻微分裂,紧密连接开放. 五、免疫组化荧光染色观察微血管内皮细胞上的骨架蛋白F-actin的表达:在荧光显微镜下,对照组动物脑内皮细胞骨架蛋白F-actin呈红色丝状,沿血管壁均匀表达;中铝组、高铝组动物脑内的微血管的F-actin表达模糊,有不连接的现象,可见血管壁有不同程度的皱缩、变形;低铝组、低锌组、中铝+高锌组微血管较为规则,丝状F-actin沿血管壁均匀表达,连续、明亮、清晰. 六、免疫组化SABC染色法观察紧密连接相关蛋白occludin的分布位置以及表达水平的变化:组织化学研究结果显示, occludin表达于内皮细胞毗邻处,呈点状和线状表达;对照组大鼠微血管内皮细胞间紧密连接相关蛋白occludin表达的平均光密度值(0.255±0.010)与中铝组(0.219±0.008)、高铝组(0.207±0.004)相比均具有显著差异, P<0.05; 中铝组(0.219±0.008)与中铝+低锌组(0.236±0.005)、中铝+高锌组(0.250±0.004)相比均具有显著差异, P<0.01; 高铝组与高铝+低锌组(0.229±0.002)、高铝+高锌组(0.242±0.003)相比均有显著差异, P<0.01. 七、Western blot法测定紧密连接相关蛋白occludin的含量变化:中铝组大鼠脑组织occludin(62-80KD)的相对光密度值(0.585±0.012)和对照组(0.701±0.048)、中铝+高锌组(0.661±0.004)相比均具有显著差异, P<0.01; 高铝组(0.427±0.003)与高铝+低锌组(0.565±0.003)、高铝+高锌组(0.678±0.014)相比, 均具有显著差异, P<0.01. 结论: 1. 小于10mg/kg浓度的铝接触显著降低了未成年SD大鼠的体重增长,但未对大鼠的学习记忆能力产生明显的影响. 2. 2.5mg/kg浓度的铝增加了未成年大鼠BBB的通透性; 大于5mg/kg浓度的铝接触增加了BBB的通透性,损伤了血管内皮细胞的超微结构,显著降低了紧密连接相关蛋白occludin的表达,改变了F-actin的表达. 3. 5mg/kg的锌未对未成年动物体重、BBB的通透性和超微结构产生明显的影响; 10mg/kg的锌显著降低了未成年SD大鼠的体重增长,增加了BBB的通透性,损伤了血管内皮细胞的超微结构,且影响了occludin和F-actin的表达. 4. 锌对铝接触导致的未成年大鼠体重增长缓慢具有显著的改善作用. 锌对铝接触导致的未成年大鼠BBB的通透性的增加和超微结构的破坏具有明显的保护作用,锌显著抑制了紧密连接相关蛋白occludin和F-actin的表达改变.

4. 期刊论文 陈伟强,程义勇,李树田,侯玥,洪燕,王冬兰, CHEN Wei-qiang, CHENG Yi-yong, LI Shu-tian, HOU Yue, HONG Yan, WANG Dong-lan 锌对心理应激大鼠不同脑区金属硫蛋白亚型表达的影响 -营养学报2006, 28 (4)

目的:观察不同锌摄入量对心理应激大鼠不同脑区金属硫蛋白亚型表达的影响.方法:将Wistar大鼠随机分为5组:正常对照组、对喂组、缺锌组和补锌组及其相应的应激组,分别给予正常、缺锌和补锌饲料,以缺锌动物当日的饲料摄入量作为对喂动物次日的给料量.动物喂饲1w后开始束缚应激,持续4w.分别以蛋白印迹法和RT-PCR测定海马、皮质、间脑和嗅球金属硫蛋白含量以及MT-1 mRNA和MT-3 mRNA的表达;并以ELISA法检测血浆IL-6和IL-1的含量.结果:缺锌动物的血锌含量明显降低,缺锌应激动物不同脑区金属硫蛋白及其亚型mRNA的表达均较缺锌动物明显升高,但其增加幅度低于其它应激组;而补锌应激动物的表达增加幅度最大.缺锌组和各应激组动物的血浆皮质醇、IL-1、IL-6水平出现显著升高.另外,金属硫蛋白在不同脑区的表达水平不同:海马>嗅球>皮质>间脑.结论:不同锌营养状况可影响心理应激动物不同脑区金属硫蛋白的表达,海马脑区表达水平较高可能与海马在应激反应中的重要作用相关联.糖皮质激素及IL-6、IL-1等细胞因子可能对金属硫蛋白的表达发挥了诱导作用.

5. 学位论文 于丹 锌离子和锌转运体在APP/PS1转基因鼠小脑老年斑内的分布与表达 2009

随着人口的逐渐老龄化,阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的发病率呈逐年上升趋势,严重危害人类健康. AD的典型病理特征包括β-淀粉样蛋白(β-amyloid, Aβ)在脑内病理沉积形成老年斑(senile plaque, SP),神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)和淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA). Aβ是AD发生和发展的中心环节,体内的Aβ由β-淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经β-和γ-分泌酶水解而成.目前大量实验证明,锌离子能增加APP转基因鼠脑内Aβ的聚集.口服金属螯合剂可以明显抑制APP转基因鼠小脑内老年斑的形成.锌离子在生长、发育、DNA合成、免疫和其他生理过程中发挥重要作用.锌离子不能自由通过细胞膜,特定的转运体和膜通道参与锌的转运和代谢.钙转运体(zinc transporter, ZnT)是参与脑锌代谢的重要蛋白家族之一,最新的研究表明, ZnT1, 3-7在AD病人和APP/PS1转基因鼠小脑内的表达明显增强,而敲除ZnT3基因的APP转基因小鼠,其脑内Aβ老年斑数量、血管淀粉样改变均明显减少,提示ZnTs与锌离子共同参与了AD的发病和病理过程.令人感兴趣的是,有文献报道,在对57位AD病人的病理学研究中发现有31位病人(占52%)的小脑内出现老年斑,但锌离子尤其是ZnTs在小脑老年斑的研究尚未见报道.因此,本研究对锌离子和ZnTs在APP/早老素(PS1)转基因鼠小脑内的分布和表达情况进行系统研究,对进一步深入探讨脑锌代谢紊乱与AD病理生理机制具有重要意义. 实验方法: 采用金属显影技术检测APP/PS1转基因鼠小脑内锌离子和ZnTs的分布和水平;应用免疫荧光双标和激光共聚焦扫描显微技术检测ZnTs在APP/PS1转基因鼠小脑内的定位分布及其与Aβ在老年斑内的共存关系;应用Western Blot技术检测APP/PS1转基因鼠小脑ZnTs的表达变化. 实验结果: 1、锌离子在APP/PS1转基因鼠小脑老年斑内的分布 AMG结果显示,AMG阳性的老年斑广泛分布于APP/PS1转基因鼠小脑内,并主要分布在分子层,在血管壁及其周围组织内也可见到明显的呈棕黑色的AMG阳性反应产物. 2、锌转运蛋白在Aβ免疫阳性的老年斑分布 免疫荧光双标的共聚焦激光扫描结果显示, Aβ免疫阳性的老年斑广泛分布于APP/PS1转基因鼠小脑皮质内,并主要集中在分子层,几乎所有Aβ阳性的老年斑均有不同程度的ZnTs表达,即ZnTs和Aβ共存于老年斑内. 3、锌转运蛋白在APP/PS1转基因鼠小脑表达改变 Western Blot结果显示, ZnTs在APP/PS1转基因鼠小脑表达均明显高于野生型对照小鼠. 结论: 1、APP/PS1转基因鼠小脑皮质内的存在大量老年斑,并主要集中在分子层,在颗粒细胞层老年斑的分布相对较少. 2、APP/PS1转基因鼠小脑内的老年斑中富含锌离子. 3、ZnTs与Aβ共表达于APP/PS1转基因鼠小脑内的老年斑中. 4、ZnTs在APP/PS1转基因鼠小脑内的表达均高于野生型小鼠. 5、锌离子和ZnTs参与

6. 期刊论文 [刘芳, 许家军, 龙建纲, 向正华, 沈慧, 张传森, 王福倬, Liu Fang, Xu Jiajun, Long Jianguang, Xiang](#)

[Zhenghua, Shen Hui, Zhang Chuansen, Wang Fudi](#) [地高辛原位杂交显示锌转运体 3 mRNA 在脑、脊髓和脊神经节中的分布](#) [解剖学杂志](#)2008, 31 (6)

目的:为研究锌转运体 3(ZnT3) 在神经系统功能中的作用提供形态学依据。方法:制备带有地高辛标记物的 ZnT3反义 RNA 探针,取雄性 SD 大鼠脑、脊髓和脊神经节行冷冻切片,作 ZnT3 mRNA 原位杂交组织化学显色,杂交后用 AKP标记的抗地高辛抗体显色。结果:脑内 ZnT3 mRNA 主要分布于海马结构,包括齿状回颗粒细胞和 CA1~CA4 区的锥体细胞,在梨状皮质、扣带后皮质中也有分布,显示的细胞较小;脑干中也有 ZnT3 mRNA 分布,面神经核处分布较多,网状结构中有少量分布;脊髓灰质前角内有少数胞体较大的细胞呈 ZnT3 mRNA 阳性;脊神经节内的多数神经元呈 ZnT3 mRNA 强阳性。结论:ZnT3 mRNA 主要分布于海马、大脑皮质、杏仁核、脑干网状结构等可塑性较强结构和周围神经神经元中,提示ZnT3 可能在学习、记忆、初级感觉传入和肌运动调控等方面发挥重要作用。

7. 期刊论文 [汪凤仪, 马建吟, Wang Feng-yi, Ma Jian-yin](#) [锌对大鼠脑区组织核酸含量的影响](#) -[黑龙江商学院学报](#)

([自然科学版](#)) 2000, 16 (3)

通过测定大鼠不同脑区锌对RNA、DNA含量的影响,探讨锌对大鼠学习记忆作用的促进是否与RNA、DNA的合成有关。

8. 学位论文 [黄琼](#) [低水平铅暴露对脑发育期大鼠智能的影响及钙、锌防护效果和机理的探讨](#) 2000

研究目的:1. 建立脑发育期低水平铅暴露损伤大鼠仔鼠神经行为的模型。2. 探讨铅神经毒性在大鼠脑发育期不同阶段的差异;3. 探讨钙、锌对大鼠脑发育期低水平铅暴露神经行为损害的保护效应及其可能机制。结论:一、母鼠孕12天→仔鼠出生后40天饮100mg/L含铅水可建成脑发育期低水平铅暴露损害大鼠仔鼠神经行为的模型;二、大鼠仔鼠出生→出生10天可能是铅对其神经行为损害的高敏期;三、饮料中1.25%钙和100mg/g锌干预均有拮抗大鼠脑发育期100mg/L铅暴露致其仔鼠神经行为损害的作用,其机理可能与降低体内铅蓄积水平,增加小脑及海马NO含量和恢复海马PKC正常活性有关。

9. 期刊论文 [赖建强, 蒯士安, 徐青梅, 胡善明, 赵显峰, 孟晶](#) [大鼠脑铅和血铅含量对学习记忆的影响与硒锌的保护作用](#)

[-卫生研究](#)2004, 33 (2)

目的探讨食物铅进入机体后对记忆功能的影响以及补充锌和硒对铅致损伤的保护作用。方法将Wistar大鼠按体重随机分为10组,在基础饲料里分别添加不同剂量的亚硝酸钠、乳酸锌及醋酸铅,实验期为12周。结果染铅各组大鼠的脑和全血中铅含量均显著高于对照组。在染铅各组中,从低硒缺锌到高硒高锌组大鼠的脑铅含量呈下降趋势,对照组大鼠的脑铅含量未检出。染铅各组大鼠血铅含量也不同程度地受饲料中硒和锌水平的影响,硒和锌对降低脑铅含量有协同作用(P<0.001)。各组大鼠发生错误次数和到达终点所需时间明显不同,缺锌低硒染铅组发生的错误次数和所需时间显著高于其他染铅各组 and 对照组(P<0.05);补硒可显著改善染铅大鼠水迷宫实验所需时间和降低错误次数(P=0.002和P=0.007)。大鼠水迷宫试验中随着脑铅和血铅含量的增加,到达终点所需时间延长和发生的错误次数增加。结论良好的锌和硒营养状况有助于降低组织中铅的水平,提示可能具有拮抗铅毒性的作用。

10. 期刊论文 [朱辛为, 刘伟明, 李质馨, 窦肇华](#) [胎脑提取液中锌铜铁的含量](#) -[第四军医大学学报](#)2002, 23 (15)

1 材料和方法 1.1 材料 胎脑提取液注射液,选用正常妊娠,6mo以内水囊引产的新鲜人胚胎脑组织,由本室制成无色透明注射液封存,每支2mL;Cerebrolysin注射液,奥地利EBEWE制药厂;星工牌脑复康(乙酰吡咯啉酮)注射液,沈阳第一制药厂;吉研牌脑复素注射液,吉林省药物研究所制药厂;迪龙牌脑复素注射液,中美合资黑龙江迪龙制药有限公司。

引证文献(1条)

1. [王丹, 赵永亮, 陈静](#) [锌转运体家族的研究进展](#) [期刊论文]-[河南师范大学学报\(自然科学版\)](#) 2009 (4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgblslzz200609027.aspx

下载时间: 2010年4月13日